

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)
(21) N° d'enregistrement national :

2 827 866

01 10139

(51) Int Cl⁷ : C 07 K 7/04, C 07 K 14/44, 14/155, 16/20, 16/10,
C 12 N 15/30, 15/48, 15/63, C 12 Q 1/68, G 01 N 33/53, 33/566,
A 61 K 38/17, 39/395, 48/00, 39/21, 39/018, A 61 P 33/00, 31/
12, 35/00

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 27.07.01.

(30) Priorité :

(43) Date de mise à la disposition du public de la
demande : 31.01.03 Bulletin 03/05.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du
présent fascicule

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : INSTITUT PASTEUR — FR, INSTI-
TUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
INRA — FR, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGA-
CIONES CIENTÍFICAS — ES et CENTRE NATIONAL
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS — FR.

(72) Inventeur(s) : GARCIA ALPHONSE, CAYLA
XAVIER, REBOLLO ANGELITA et LANGSLEY GOR-
DON.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : ERNEST GUTMANN YVES PLASSE-
RAUD SA.

(54) PEPTIDES SYNTHÉTIQUES OU NATURELS LIANT LA PROTEINE PHOSPHATASE 2A, MÉTHODE
D'IDENTIFICATION ET UTILISATIONS.

(57) L'invention a trait à de nouveaux peptides synthéti-
ques ou naturels utiles en particulier dans le traitement des
infections virales ou parasitaires ou dans le traitement de tu-
meurs, lesdits peptides étant d'une taille inférieure à 30 aci-
des aminés, de préférence 20 acides aminés, et
caractérisés en ce qu'ils lient, *in vitro*, une holoenzyme pro-
téine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités.
L'invention a aussi trait à une méthode d'identification de
tels peptides, et à leurs utilisations.

FR 2 827 866 - A1



PEPTIDES SYNTHETIQUES OU NATURELS LIANT LA PROTEINE PHOSPHATASE 2A, METHODE D'IDENTIFICATION ET UTILISATIONS

L'invention a trait à de nouveaux peptides, synthétiques ou naturels
5 utiles en particulier dans le traitement des infections virales ou parasitaires
ou dans le traitement de tumeurs, lesdits peptides étant d'une taille
inférieure à 30 acides aminés, de préférence 20 acides aminés, et
caractérisés en ce qu'ils lient, *in vitro*, de manière spécifique, une
holoenzyme protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités.
10 L'invention a aussi trait à une méthode d'identification de tels peptides, et à
leurs utilisations.

Etant donné le rôle des peptides de l'invention dans la modulation de
l'activité de la protéine phosphatase 2A cellulaire, il est important de
rappeler en introduction les connaissances actuelles sur les protéine
15 phosphatases 2A, leur rôle physiologique et leurs interactions avec
certaines protéines cellulaires, virales ou parasitaires.

La physiologie de la cellule est contrôlée en partie par la modulation
de l'état de phosphorylation des protéines. L'état de phosphorylation des
protéines cellulaires dépend de l'action antagoniste des protéine kinases
20 qui les phosphorylent et des protéine phosphatases qui les
déphosphorylent.

Les protéine phosphatases sont divisées en deux groupes
principaux: les tyrosine phosphatases et les sérine/thréonine
phosphatases. Les sérine/thréonine phosphatases sont classées en deux
25 catégories selon la spécificité de leur substrat et leur sensibilité à certains
inhibiteurs, les phosphatases de type 1 (PP1) et les phosphatases de type
2 (PP2). Les phosphatases de type 2 se divisent encore en différentes
classes, incluant la phosphatase 2A (PP2A), la phosphatase 2B ou
calcineurine dont l'activité est régulée par le calcium, et la phosphatase 2C
30 (PP2C) dont l'activité est régulée par le magnésium.

On sait maintenant que les phosphatases de type 2A sont très conservées au cours de l'évolution et sont potentiellement impliquées dans la régulation de nombreux processus biologiques. Les enzymes PP2A ont clairement été impliquées dans la régulation de la transcription, le contrôle 5 du cycle cellulaire ou de la transformation virale. En outre, les PP2A sont la cible de différentes protéines virales ou parasitaires, suggérant un rôle des PP2A dans les interactions hôtes-pathogènes.

Les PP2A sont des complexes oligomériques (holoenzymes) comprenant chacun, une sous-unité catalytique (C) et une ou deux sous- 10 unités régulatrices, (A) et (B). La structure de la sous-unité (A) consiste en 15 répétitions imparfaites d'une séquence d'acides aminés conservée de 38 à 40 acides aminés, dont certaines interagissent avec les sous-unités (B) et (C). Les sous-unités (A) et (C), conservées au cours de l'évolution, 15 constituent la structure de base de l'enzyme et sont exprimées constitutivement. Au contraire, les sous-unités (B) constituent une famille de protéines régulatrices non reliées par une structure commune et différemment exprimées (Cohen P. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* 1989 ; 58 : 453-508). Ainsi, Les protéine phosphatase 2A existent *in vivo* sous deux classes de forme 20 différente : une forme dimérique (AC) et une forme trimérique (ABC). Les sous-unités (B) régulent l'activité phosphatasique et la spécificité vis-à-vis du substrat. L'existence de formes multiples de PP2A est corrélée à des fonctions distinctes et variées des PP2A *in vivo*.

Récemment, différentes protéines non cellulaires, et en particulier 25 des protéines virales et parasitaires ont été impliquées dans la modulation de certaines activités spécifiques des protéine phosphatase 2A.

Différentes stratégies impliquant PP2A ont été adoptées par les virus pour faciliter leur réplication et leur survie dans la cellule hôte. Par exemple, le *parainfluenza* virus incorpore dans sa particule virale la protéine PKC ζ , 30 protéine d'origine cellulaire sous le contrôle de PP2A. Ceci lui permet de

perturber la phosphorylation des protéines de son hôte et de faciliter sa propre réplication (De BP, Gupta S., Barnejee AK. Cellular protein kinase C ξ regulates human parainfluenza virus type 3 replication. Proc. Natl. Acad. Sci USA 1995 ; 92 :5204-8).

5 Plusieurs virus à ADN ayant un pouvoir transformant, tels que les papovae ou les adénovirus, de même que certains rétrovirus, tels que le virus de l'immunodéficience humaine type 1 (VIH-1) codent pour des protéines qui interagissent directement avec certaines PP2A de l'hôte. 10 Tous ces virus comprennent des protéines qui bien que structurellement différentes, interagissent avec certaines holoenzymes et en modifient l'activité phosphatasique.

15 Il a été montré en particulier que la protéine E4orf4 des adénovirus se lie à une PP2A hétérotrimérique, et plus précisément à une sous-unité régulatrice (B), ce qui entraîne une diminution de la transcription de JunB dans la cellule infectée. Cet effet pourrait jouer un rôle important durant l'infection virale en régulant la réponse apoptotique des cellules infectées. 20 De manière intéressante, il a aussi été montré que l'interaction de E4orf4 avec PP2A induit l'apoptose des cellules transformées d'une manière p53-indépendante (Shtrichman R. et al. Adenovirus type 5 E4 open reading frame 4 protein induces apoptosis in transformed cells. J. Virol. 1998 ; 72 : 2975-82).

25 Les virus générant des tumeurs de la famille des Papovae, incluant SV40 et le virus du polyome, induisent la transformation cellulaire. Il a été montré que PP2A interagit avec l'antigène « petit T » de SV40 ou du polyome ainsi qu'avec la protéine transformante « moyen T » du polyome. Ces interactions de protéines virales avec PP2A ont été clairement impliquées dans la transformation virale. Enfin, la régulation transcriptionnelle, un processus normalement réalisé dans la cellule par les différents facteurs se fixant spécifiquement sur des séquences régulatrices 30 promotrices, représente probablement le mécanisme le plus important

impliqué dans le contrôle de l'expression virale par PP2A. Ainsi, il a été démontré que PP2A est un régulateur négatif de nombreux facteurs de transcription impliqués notamment dans les processus de croissance et de prolifération cellulaire, incluant AP1/SRE, NF-κB, Sp1 et CREB (Waszinski, 5 B.E., Wheat W. H., Jaspers S., Peruski L.F., JR Lickteig R.L., Johnson G.L., and Klemm D.J. Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB Transcriptional stimulation. *Mol Cell Biol.* 1993 13, 2822-34). La régulation virale de ces facteurs de transcription permettrait de moduler la 10 transcription virale.

La protéine virale de VIH-1, *Vpr*, interagit *in vitro* avec PP2A et stimule l'activité catalytique de PP2A (Tung L, et al, Direct activation of protein phosphatase 2A0 by HIV-1 encoded protein complex Ncp7:vpr. *FEBS Lett* 1997 ; 401 : 197-201). *Vpr* peut induire l'arrêt en G2 des cellules infectées en inhibant l'activation du complexe p34cdc2-cycline B. D'autre part, *Vpr* interagit avec le facteur de transcription Sp1 et est un trans-activateur faible de la transcription de VIH-1 Sp1 dépendante. Ainsi, la protéine *Vpr* de VIH-1, qui est incorporée dans le virion, serait impliquée *in vivo* dans l'initiation de la transcription virale, une étape évidemment essentielle pour réguler l'expression du facteur de transcription Tat (un 15 régulateur majeur de la transcription codé par le virus VIH-1). 20

Au contraire du rôle bien établi des protéine kinases dans les infections parasitaires, c'est seulement au cours de ces trois dernières années que les sérine/thréonine phosphatases ont commencé à être 25 reconnues comme étant des régulateurs potentiels importants dans le domaine de la parasitologie.

Initialement, deux sérine-thréonine phosphatases, Pp β et PfPP ont été identifiées dans *Plasmodium falciparum*. La présence d'activité phosphatasique de type 1 et de type 2A dans le parasite a été démontrée

par des études enzymologiques. Dernièrement, des enzymes parasitaires PP2A et PP2B ont été purifiées.

Les sérine/thréonine phosphatases ont été récemment étudiées chez *Theileria parva*, un autre protozoaire proche de *P. falciparum* qui 5 parasite les bovins. Les cellules hôtes, monocytes et leucocytes, qui sont infectées par le parasite sont transformées, ce qui se traduit par une leucémie chez l'animal. Les parasites purifiés de cellules infectées par *Theileria* expriment une protéine kinase CK2 α . Or, la sous-unité CK2 α interagirait avec PP2A pour moduler positivement son activité (Hériché H., 10 et al. Regulation of Protein Phosphatase 2A by direct interaction with casein kinase 2 α . *Science* 1997 ; 276 : 952-5). Aussi, la modulation de la PP2A via l'expression de la sous-unité CK2 α pourrait être à la base du blocage de deux voies de signalisation dans la cellule parasitée, celle des 15 MAP-kinases (Chaussepied M., et al. *Theileria transformation of bovine leukocytes: a parasite model for the study of lymphoproliferation*. *Res Immunol*. 1996 ; 147 : 127-38) et celle de la protéine kinase B (Akt) (M. Baumgartner, M. Chaussepied, MF Moreau, A. Garcia, G. Langsley. Constitutive PI3-K activity is essential for proliferation, but not survival, of 20 *Theileria parva* – transformed B Cells. *Cellular Microbiol*. (2000) 2, 329-339).

L'absence de motifs communs à l'ensemble des protéines interagissant avec PP2A empêche l'identification bio-informatique des motifs peptidiques directement impliqués dans la liaison de ces protéines avec PP2A.

25 Or, étant donné le rôle majeur des protéine phosphatases 2A dans les interactions virus-hôtes ou parasites-hôtes tel que résumé ci-dessus, on comprend l'intérêt d'identifier les sites de liaison des protéines virales ou parasites avec les holoenzymes PP2A ou l'une de leurs sous-unités, afin 30 d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour ces pathogènes, viraux ou parasitaires.

En particulier, l'identification des peptides interagissant avec PP2A permettrait de produire de nouveaux médicaments susceptibles de bloquer par inhibition compétitive les mécanismes cellulaires induits par les protéines virales ou parasitaires via leur interaction avec PP2A et en particulier les mécanismes d'infection, de prolifération des pathogènes et de transformation des cellules.

L'invention s'intéresse à des moyens d'identifier des peptides de taille réduite, liant une holoenzyme PP2A ou l'une de ses sous-unités. Au contraire des protéines natives ou domaines polypeptidiques de taille importante, des peptides de taille réduite ont l'avantage d'être aisément synthétisés, par voie chimique ou en systèmes cellulaires, avec un rendement important et un coût réduit. Les peptides de l'invention sont en outre plus stables et plus facilement transférés dans le cytoplasme ou dans le noyau des cellules à l'aide de vecteurs appropriés, en vue d'une utilisation thérapeutique.

L'invention découle de la démonstration qu'il est possible d'identifier des peptides, d'une taille inférieure à 30 acides aminés, et notamment des peptides d'une taille inférieure à 20 acides aminés interagissant avec une holoenzyme PP2A ou l'une de ses sous-unités.

En particulier, les inventeurs ont montré que l'utilisation de la technique des « SPOT synthesis » décrites par Frank et Overwing (*Methods in Molecular Biology*, 1996, vol. 66 : 149-169, *Epitope Mapping Protocols edited by : G.E. Morris Humana Press Inc., Totowa NJ*) permet d'identifier les sites de liaison des protéines interagissant avec une holoenzyme PP2A ou l'une de ses sous-unités.

Les inventeurs ont par exemple identifié des peptides d'une taille inférieure à 20 acides aminés, interagissant *in vitro* avec l'holoenzyme PP2A purifiée ou l'une de ses sous-unités, lesdits peptides étant dérivés de la protéine *Vpr* de VIH-1 ou de la protéine CK2 α du parasite *T. parva*. Des antagonistes dérivés de ces peptides et sélectionnés parce qu'ils inhibent

l'interaction des protéines virales ou parasitaires avec une holoenzyme particulière de PP2A pourraient ainsi constituer de nouveaux agents antitumoraux, antiviraux ou antiparasitaires.

5 L'invention porte sur une méthode d'identification d'un peptide dont la séquence est issue d'une protéine virale, parasitaire ou cellulaire, ledit peptide liant spécifiquement une holoenzyme protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités, ladite méthode comprenant les étapes consistant à :

- 10 a) déposer sous forme de spots, sur un support, des peptides dont la séquence est issue d'une protéine virale, parasitaire ou cellulaire, chaque spot correspondant au dépôt d'un peptide de séquence définie,
- 15 b) mettre en contact le support solide avec une solution contenant une holoenzyme protéine phosphatase 2A ou l'une de ses sous-unités dans des conditions permettant aux peptides présents sur le support, de lier l'holoenzyme ou l'une de ses sous-unités, et,
- 20 c) à identifier sur le support solide, le peptide sur lequel se fixe la protéine phosphatase 2A ou l'une de ses sous-unités.

25 Selon l'étape a), différents peptides sont déposés sur un support solide à des positions définies (« spot »), chaque position correspondant à une séquence peptidique spécifique et l'ensemble formant ainsi un réseau de peptides (« array ») à deux dimensions. Différentes méthodes de préparation de tels réseaux ont été décrites récemment (pour revue, Figeys et Pinto, 2001 *Electrophoresis* 22 : 208-216 ; Walter et al., 2000 *Curr Opin Microbiol* 3 : 298-302). L'ensemble de ces méthodes comprend en général la fixation covalente de peptides sur un support, en particulier à l'aide de lieurs (linkers) chimiques. A titre d'exemple, l'homme du métier pourra notamment se reporter à la technique des « SPOT synthesis » consistant à synthétiser directement sur une membrane de cellulose, des peptides comprenant jusqu'à 20 résidus (Frank et Overwing, *Methods in Molecular*

Biology, 1996, vol. 66 : 149-169, Epitope Mapping Protocols edited by : G.E. Morris Humana Press Inc., Totowa NJ).

De manière générale, toute méthode peut être utilisée dès lors que celle-ci permet l'obtention d'un réseau de peptides déposés sur un support solide, utilisable pour détecter des interactions spécifiques entre les peptides déposés et des composés particuliers.

De façon très préférée, l'ensemble des séquences de peptides déposés recouvre la séquence complète de la protéine virale, parasitaire ou cellulaire dont ces séquences sont issues. Ainsi, le procédé permet de tester en une seule étape la séquence complète d'une protéine donnée, celle-ci étant « sectionnée » en un nombre fini de peptides, de séquences généralement chevauchantes.

Dans un mode de réalisation préféré, les peptides déposés sous forme de spot sont d'une taille inférieure à 20 acides aminés, et mieux, d'une taille inférieure à 15 acides aminés.

Dans un autre mode de réalisation particulier, les peptides sont déposés sur une membrane de cellulose.

Le réseau ainsi obtenu est mis en contact à l'étape b), avec une holoenzyme protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités.

Par « holoenzyme protéine phosphatase de type 2A », il faut comprendre tout complexe dimérique (AC) ou hétérotrimérique (ABC), purifié d'un extrait cellulaire ou reconstitué après purification des deux sous-unités (A) et (C) d'une protéine phosphatase de type (2A) et le cas échéant d'une sous-unité (B). Les protéine phosphatases de type (2A) sont de préférence issues de mammifères.

Les supports sont incubés par exemple dans une solution tampon comprenant les protéine phosphatase purifiées ou l'une de leurs sous-unités purifiées. Une solution tampon utilisable est le TBS (TRIS BORATE) contenant 5% de régilait écrémé et 3% de BSA.

Le peptide sur lequel se fixe l'holoenzyme protéine phosphatase de type 2A est identifié en général par le marquage direct ou indirect de la

protéine phosphatase et l'identification des spots au niveau desquels s'est fixé la protéine marquée. La fixation de la PP2A ou l'une de ses sous-unités au niveau de l'un des spots de peptides peut ainsi être révélée en particulier à l'aide d'antisérum, selon les techniques classiquement utilisées pour le Western Blot ou le test ELISA en phase solide, après incubation du support contenant le réseau de peptides avec un anticorps dirigé contre les sous-unités (A) ou (B) ou (C) ou un mélange d'anticorps dirigé contre les sous-unités (A), (B) ou (C) de PP2A.

L'application de la méthode de l'invention définie ci-dessus conduit à l'identification de peptides, notamment utiles dans le traitement de certaines infections virales ou parasitaires, d'une taille inférieure à 30 acides aminés, voire inférieure à 20 acides aminés, lesdits peptides étant capables de lier *in vitro* une holoenzyme protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités.

Dès lors, en utilisant ses connaissances générales dans le domaine de la synthèse peptidique, l'homme du métier peut produire des peptides, dérivés des fragments de peptides identifiés par la méthode de l'invention présentant les propriétés avantageuses décrites ci-dessus.

Par conséquent, l'invention vise un peptide, naturel ou synthétique, d'une taille inférieure à 30 acides aminés, de préférence inférieure à 20 acides aminés, caractérisé en ce qu'il lie *in vitro*, de manière spécifique, une holoenzyme protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités, (A), (B) ou (C). Par liaison spécifique, il faut comprendre que le peptide est capable d'inhiber de manière compétitive la liaison d'une protéine d'origine virale ou parasitaire avec des PP2A.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, le peptide de l'invention est caractérisé en ce qu'il s'agit d'un fragment d'une protéine virale, parasitaire ou cellulaire, ladite protéine liant *in vitro* une protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités, ou d'une séquence se distinguant du fragment de protéine précédent par substitution ou délétion

d'acides aminés, ladite séquence distincte conservant néanmoins les propriétés de liaison à une protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités.

En particulier, une séquence distincte est une séquence peptidique augmentant l'affinité de liaison à la protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités par rapport à la séquence dont elle dérive. Une autre séquence distincte telle que définie plus haut est une séquence peptidique homologue à une séquence peptidique identifiée initialement, c'est-à-dire une séquence dérivée d'une protéine d'une autre espèce que la séquence peptidique identifiée initialement, et dont la séquence primaire peut être alignée avec la séquence peptidique identifiée initialement à l'aide d'un programme d'alignement optimal classiquement utilisé, tel que le programme BESTFIT (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, GCG). En particulier, une séquence A sera considérée comme homologue à une séquence B si lesdites séquences A et B présentent au moins 50% d'identité, de préférence 75% d'identité, après alignement des séquences à l'aide d'un programme d'alignement optimal tel que le programme BESTFIT. De manière encore préférée, deux séquences sont aussi considérées homologues si les séquences sont quasi-identiques à l'exception de quelques résidus pouvant représenter 10 à 20% de variabilité sur la séquence totale. Par ailleurs les acides aminés de même fonction chimique (telles que par exemple, Arg et Lys) sont considérés comme équivalents. Les peptides à analyser pour leur liaison avec une PP2A ou l'une de ses sous-unités, sont en général choisis parmi des fragments de protéines virales, parasitaires ou cellulaires, lesquels protéines ont été montrées interagir *in vivo* ou *in vitro* avec une protéine phosphatase de type 2A.

De telles protéines virales, parasitaires ou cellulaires sont en particulier choisies parmi l'une des protéines suivantes : antigène t de SV40 ou de polyôme, antigène moyen t de polyôme, sous unité de PP2A de type

B (B, B', B''), CK2 α , CaMIV, p70S6-kinase, Pak1/Pak3, Tap42/alpha 4, PTPA, Set/I1/I2-PP2A, E4orf4, tau, Vpr ou CD28, CCXR2 (récepteur de chemokine).

Un peptide de l'invention particulièrement préféré est un fragment de la protéine Vpr du virus VIH, en particulier un fragment de la protéine Vpr du virus VIH-1 ou VIH-2, ou une séquence se distinguant du fragment de protéine précédent par substitution ou délétion d'acides aminés, ladite séquence distincte conservant néanmoins les propriétés de liaison à la protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités.

De manière encore préférée, un peptide selon l'invention est caractérisé en ce qu'il est inclus dans l'une des séquences suivantes :

- a) VEALIRILQQQLLFIHFRI (SEQ ID NO :1),
- b) RHSRIGIIQQRRTRNG (SEQ ID NO:2), ou,
- c) une séquence se distinguant de SEQ ID NO :1 ou SEQ ID NO :2 par substitution ou délétion d'acides aminés, ladite séquence distincte conservant néanmoins les propriétés de liaison pour la protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités.

Parmi les peptides de séquences se distinguant de SEQ ID NO :1 ou SEQ ID NO :2 par substitution ou délétion d'acides aminés, et entrant dans le cadre de l'invention, on citera plus particulièrement les peptides dont la séquence est incluse dans l'une des séquences de la protéine Vpr des différents variants du type VIH-1, VIH-2 et de SIV, et correspondant aux séquences homologues chez ces variants de SEQ ID NO :1 ou SEQ ID NO :2.

On peut citer notamment les séquences VEALIRILQQQLL (SEQ ID NO : 6), ALIRILQQQLLFI (SEQ ID NO : 7), IRILQQQLLFIHF (SEQ ID NO : 8), ILQQQLLFIHFR (SEQ ID NO : 9), RHSRIGIIQQRR (SEQ ID NO : 10), SRIGIIQQRRTR (SEQ ID NO : 11) et IGIIQQRRTRNG (SEQ ID NO : 12)

correspondant aux dodécapeptides identifiés comme liant la sous-unité A de PP2A.

Un peptide préféré selon l'invention est un peptide choisi parmi l'une des séquences SEQ ID NO :1 ou SEQ ID NO :2 et caractérisé en ce que son administration induit l'apoptose des cellules tumorales.

Un autre mode de réalisation préféré de l'invention fournit un peptide caractérisé en ce qu'il dérive d'un fragment de la protéine CK2 α . En particulier, le peptide, naturel ou synthétique, est caractérisé en ce qu'il dérive d'un fragment de la protéine CK2 α du parasite *Theileria parva*.

De manière encore préférée, un peptide selon l'invention est caractérisé en ce qu'il est inclus dans l'une des séquence suivantes :

- a) RKIGRGKFSEVFEG (SEQ ID NO :3),
- b) TVTKDCVIKILKPVKKKKIKREIKILQNL (SEQ ID NO: 4),
- c) KILRLIDWGLAEFYHP (SEQ ID NO: 5),
- d) Une séquence homologue de SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :4 ou SEQ ID NO :5 dérivée de *P. falciparum* ou *leishmania*, ou,
- e) une séquence se distinguant des séquences mentionnées ci-dessus par substitution ou délétion d'acides aminés, ladite séquence distincte conservant néanmoins les propriétés de liaison à la protéine phosphatase 2A ou l'une de ses sous-unités.

Parmi les peptides se distinguant des séquences SEQ ID NO : 3, NO : 4 ou NO :5, on peut citer notamment les séquences du site 1 (RKIGRGKFSEVFEG) (SEQ ID NO : 3), et notamment le peptide de séquence RKIGRGKFSEVF et le peptide de séquence IGRGKFSEVFEG ou les séquences du site 2 (TVTKDKCVIKILKPVKKKKIKREIKILQNL) (SEQ ID NO : 4) notamment les peptides suivants :

- TVTKDKCVIKIL (SEQ ID NO : 13),
- TKDKCVIKILKP (SEQ ID NO : 14),
- DKCVIKILKPVK (SEQ ID NO: 15),
- CVIKILKPVKKK (SEQ ID NO : 16),

IKILKPVKKKKI (SEQ ID NO : 17),
ILKPVKKKKIKR (SEQ ID NO : 18),
KPVKKKKIKREI (SEQ ID NO : 19),
VKKKKIKREIKI (SEQ ID NO : 20),
5 KKKIKREIKILQ (SEQ ID NO : 21),
KIKREIKILQNL (SEQ ID NO: 22),
et enfin les séquences du site 3 KILRLIDWGLAEFTHP (SEQ ID NO : 5)
soit le peptide de séquence KILRLIDWGLAE (SEQ ID NO : 23), le peptide
de séquence LRLIDWGLAEFY (SEQ ID NO : 24), ou le peptide de
10 séquence LIDWGLAEFYHP (SEQ ID NO : 25).

De préférence, l'invention porte sur un peptide dérivé de la protéine CK2α du parasite *Theileria parva* caractérisé en ce que son administration réduit le développement parasitaire.

15 Un autre mode de réalisation des peptides de l'invention est caractérisé en ce que les peptides sont dérivés de la protéine tau. La séquence tau présente un motif correspondant au site de liaison de la protéine E4orf4 d'adénovirus. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, la protéine tau est régulée par la protéine phosphatase 2A. De tels peptides seraient donc utiles dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.

20 Les peptides identifiés par la méthode de l'invention sont particulièrement utiles dans le traitement de certaines tumeurs, de certaines infections virales ou parasitaires. L'homme du métier peut sélectionner, à l'aide de tests de compétition de liaison, de nouveaux peptides, dérivés des séquences identifiées selon la méthode de l'invention, lesdits peptides inhibant de manière compétitive la liaison de la protéine native dont il dérive avec une holoenzyme PP2A ou l'une de ses sous-unités.

25 Ainsi, l'invention concerne également un peptide naturel ou synthétique, tel que défini plus haut, caractérisé en ce qu'il inhibe de manière compétitive, l'interaction de la protéine native dont il dérive avec une holoenzyme PP2A ou l'une de ses sous-unités.

Les peptides selon l'invention, pour être efficace *in vivo* dans le traitement de certaines tumeurs ou certaines infections virales ou parasitaires, peuvent être couplés à un vecteur capable de transférer ledit peptide dans une cellule eucaryote. La taille réduite des peptides de l'invention leur permet de traverser plus facilement la membrane cellulaire. L'utilisation de vecteurs appropriés permet en outre de cibler les peptides à certains tissus, certaines cellules, voire certains compartiments cellulaires particuliers, et notamment, le cytoplasme ou le noyau des cellules, en fonction de l'effet thérapeutique recherché.

A titre d'exemple, la demande de brevet WO 97/02840 décrit des vecteurs susceptibles d'être couplés aux peptides de l'invention pour le transfert des peptides couplés à ces vecteurs dans les cellules.

L'invention porte naturellement sur les moyens permettant la synthèse des peptides de l'invention. En particulier, l'invention porte sur un polynucléotide caractérisé en ce que sa séquence consiste en la séquence codante d'un peptide selon l'invention. Des polynucléotides préférés sont les polynucléotides dont la séquence est choisie parmi l'une des séquences suivantes

SEQ IDs NO : 26

(5'GTGGAAGCCTAATAAGAATTCTGCAACAACTGCTGTTATTCAATT
CAGAATT),

NO : 27

(5'CGACATAGCAGAATAGGCATTATTCAACAGAGGAGAACAAAGAAATG
GA),

NO : 28

(5'-AGGAAGATCGGAAGAGGGAGTTCAGTGAAGTTTGAGGGA),

NO : 29

(5'ACAGTAACGAAGGATAATGCGTAATAAAATCCTAAAGCCTGTAAA
GAAGAAGAAAATCAAGAGAGAGATTAAGATTCTACAGAACCTA),

ou NO : 30

(5'AAAATACTAAGGCTAATTGACTGGGGATTAGCTGAGTTTACCA

A), codant respectivement les peptides NO : 1-5.

5 Il peut être avantageux de synthétiser un polypeptide comprenant la répétition des motifs peptidiques identifiés par le procédé de l'invention. Par conséquent, l'invention porte sur un polynucléotide caractérisé en ce qu'il consiste en un multimère du polynucléotide codant pour un peptide de l'invention. L'invention porte également sur un polypeptide caractérisé en ce qu'il est constitué de la répétition d'un peptide selon l'invention.

10 L'invention porte également sur un vecteur d'expression cellulaire, caractérisé en ce qu'il comporte un polynucléotide tel que défini plus haut et des séquences régulatrices permettant l'expression d'un peptide selon l'invention dans une cellule hôte.

15 L'invention vise également la méthode de préparation d'un peptide tel que défini selon l'invention, comprenant la transformation d'un hôte cellulaire à l'aide d'un vecteur d'expression cellulaire tel que défini plus haut, suivi de la mise en culture de l'hôte cellulaire ainsi transformé, et la récupération du peptide dans le milieu de culture.

20 L'invention porte en outre sur un anticorps purifié polyclonal ou monoclonal caractérisé en ce qu'il est capable de lier de façon spécifique un peptide selon l'invention.

25 Des anticorps spécifiquement dirigés contre les peptides identifiés par le procédé de l'invention sont obtenues, par exemple par immunisation d'un animal après injection d'un peptide selon l'invention, et récupération des anticorps produits. Un anticorps monoclonal peut être obtenu selon les techniques connues de l'homme du métier telle que la méthode des hybridomes décrites par Kohler et Milstein (1975).

30 Les anticorps obtenus, spécifiquement dirigés contre des cibles de la protéine phosphatase 2A trouvent leur application en particulier dans l'immunothérapie. Ils peuvent par exemple servir d'antagonistes de

protéines virales ou parasitaires dirigés contre la protéine phosphatase 2A afin de bloquer le développement viral ou parasitaire.

De même, les polynucléotides codant les peptides de l'invention peuvent être directement transférés au noyau de cellules cibles, le cas échéant à l'aide de vecteurs appropriés, afin de permettre l'expression *in vivo* des peptides correspondants, lesdits peptides étant susceptibles de bloquer par inhibition compétitive une interaction spécifique entre la protéine phosphatase 2A et la protéine virale ou parasitaire dont ils dérivent.

Ainsi, l'invention porte sur une composition pharmaceutique comprenant un des éléments choisis parmi un polynucléotide selon l'invention ou un anticorps selon l'invention.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant l'un des peptides de l'invention en combinaison avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

L'invention vise en outre une utilisation d'un peptide de l'invention défini plus haut, dans la préparation d'un médicament utile dans le traitement d'une infection virale ou parasitaire.

L'invention vise préférentiellement l'utilisation d'un peptide dont la séquence dérive d'un fragment de la protéine Vpr, tel que défini plus haut, dans la préparation d'un médicament apte à inhiber l'infection au VIH.

Les peptides de l'invention peuvent être avantageusement choisis de manière à stimuler l'induction de l'apoptose liée à l'activation de la protéine phosphatase 2A cellulaire. Ainsi, l'invention concerne également l'utilisation d'un peptide selon l'invention, tel que défini plus haut, dans la préparation d'un médicament apte à induire l'apoptose de cellules cibles, et en particulier de cellules tumorales.

Un autre aspect préféré de l'invention concerne l'utilisation d'un peptide dont la séquence dérive d'un fragment de la protéine CK2 α , dans la préparation d'un médicament apte à inhiber l'infection parasitaire. Plus

particulièrement, l'invention vise l'utilisation d'un peptide dans la préparation d'un médicament utile dans le traitement du paludisme.

5

L'infection virale ou parasitaire se traduit par une expression spécifique des protéines comprenant les séquences de peptides de l'invention. Les séquences codant les peptides de l'invention peuvent donc être utilisées comme sonde pour détecter, de manière spécifique, à partir d'ARN extrait d'un échantillon biologique d'un patient, une infection virale ou parasitaire spécifique.

10

De même, un anticorps selon l'invention peut être utilisé pour reconnaître spécifiquement les séquences peptidiques contenues dans les protéines virales ou parasitaires exprimées lors de l'infection.

Ainsi, l'invention porte donc sur l'utilisation d'un polynucléotide selon l'invention ou d'un anticorps selon l'invention dans le diagnostic *in vitro* de pathologies parasitaires ou virales.

15

La partie expérimentale qui suit illustre une application de la méthode d'identification des peptides de l'invention à l'identification de peptides issus de la protéine Vpr du VIH-1 et de la protéine CK2 α du parasite *Theileria parva*.

20

DESCRIPTION DES FIGURES

25

Figure 1 : Criblage d'une membrane contenant des peptides recouvrant la séquence Vpr de HIV-1 avec la sous-unité structurale A de PP2A (A) et l'holoenzyme PP2A1(B).

Le recouvrement de la séquence des quatre peptides 54-57 définit la séquence du site 2 VEALIRILQQLLFIHFRI (SEQ ID NO : 1)

30

Peptide 54 : VEALIRILQQLL

Peptide 55 : ALIRILQQLLFI

Peptide 56 : IRILQQLLFIHF

Peptide 57 : ILQQLLFIHFRI

5 Le recouvrement de la séquence des trois peptides 64 à 66 définit la séquence du site 1 RHSRIGIIQQRRTRNG (SEQ ID NO : 2)

Peptide 64 : RHSRIGIIQQRR

Peptide 65 : SRIGIIQQRRTR

Peptide 66 : IGIIQQRRTRNG

10

Figure 2 : Criblage d'une membrane contenant des peptides recouvrant la séquence de CK2 α de *Theileria* avec (A) la sous-unité structurale A de PP2A et (B) l'holoenzyme PP2A1.

15 Le recouvrement de la séquence des deux peptides définit la séquence du site 1 RKIGRGKFSEVFEG (SEQ ID NO : 3)

Peptide 66 : RKIGRGKFSEVF

Peptide 67 : IGRGKFSEVFEG

20 Le recouvrement de la séquence des dix peptides 74-83 définit la séquence du site 2 TVTKDKCVIKILKPVKKKKIKREIKILQNL (SEQ ID NO : 4)

Peptide 74 : TVTKDKCVIKIL

Peptide 75 : TKDKCVIKILKP

Peptide 76 : DKCVIKILKPVK

25 Peptide 77 : CVIKILKPVKKK

Peptide 78 : IKILKPVKKKKI

Peptide 79 : ILKPVKKKKIKR

Peptide 80 : KPVKKKKIKREI

Peptide 81 : VKKKKIKREIKI

Peptide 82 : KKKIKREIKILQ
Peptide 83 : KIKREIKILQNL

Le recouvrement de la séquence des trois peptides définit la sequence du site 3 KILRLIDWGLAEFTHP (SEQ ID NO : 5)

5 Peptide 129 : KILRLIDWGLAE
Peptide 130 : LRLIDWGLAEFY
Peptide 131 : LIDWGLAEFYHP

PARTIE EXPERIMENTALE

10

A. Matériels et méthodes

A.1 Les protéines PP2A purifiées

15 La protéine trimérique PP2A1 a été purifiée à homogénéité à partir de cerveau de porc.

Une sous-unité structurale recombinante de PP2A a été exprimée chez *E. coli* et purifiée selon le protocole décrit par Cohen et al. (Cohen P., Alemany S, Hemmings BA, Resink TJ, Stralfors P., Tung HY. Protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A from rabbit skeletal muscle. Methods Enzymol. 1988 159, 390-408), ou celui décrit par Bosch et al., (Bosch M, Cayla X, Van Hoof C, Hemmings BA, Ozon R., Merlevede W, Goris J. The PR55 and PR65 subunits of protein phosphatase 2A from *Xenopus laevis*. Molecular cloning and developmental regulation of expression. Eur J. Biochem. 1995 230,1037-45).

A.2 -Méthode d'identification des sites de liaison de Vpr de VIH et CK2 α de *Theileria parva* (*T.parva*) avec PP2A

5 Des peptides de liaison dérivés des protéines CK2 α (codée par le protozoaire *T. parva*) ou Vpr (codée par le virus VIH-1) avec PP2A ont été identifiés en utilisant la technique des « peptides spot » précédemment décrite (Frank et Overwing. (1996). *Meth. Mol. Biol.* 66, 149-169).

10 La méthode a consisté à synthétiser *in situ* sur une membrane de cellulose, à des positions définies, des dodécapeptides, dont l'ensemble 15 des séquence recouvre la totalité de la séquence de la protéine d'intérêt (Vpr ou CK2 α). Les peptides de deux spots consécutifs sur la membrane, se chevauchent avec un décalage de deux acides aminés.

15 Soixante huit (68) dodécapeptides recouvrant toute la séquence de la protéine Vpr de VIH-1 et deux cent cinq (205) dodécapeptides recouvrant 20 la séquence de la protéine CK2 α de *Theileria* ont été synthétisés et liés de façon covalente à des membranes de cellulose.

25 Chaque membrane ainsi préparée est d'abord saturée 1 heure à température ambiante avec du TBS contenant 5% de régilait écrémé et 3% de BSA puis incubée une nuit dans le même tampon en présence de 4 μ g/ml de protéine purifiée (sous-unité A de PP2A ou holoenzyme PP2A1). L'interaction spécifique de chaque protéine purifiée (respectivement la sous-unité structurale A ou l'holoenzyme trimérique PP2A1) avec une séquence peptidique est révélée, comme un western blot, après incubation de la membrane avec un anticorps dirigé contre la protéine structurale A (Figures 1A et 2A) et avec un mélange d'anticorps reconnaissant les protéines A,B, et C de PP2A (Figures 1B et 2B).

Les membranes sont lavées 5 fois 15 minutes avec un tampon classique TBST (TBS + TWEEN), utilisé pour l'incubation puis à nouveau incubées 1 heure à température ambiante avec un second anticorps

(couplé à la peroxydase). Enfin, les membranes sont lavées 5 fois 15 minutes avec le tampon TBST et révélées.

B. RESULTATS ET DISCUSSION

5

B.1 Identification de séquences peptidiques contenant des sites de liaison de protéines codées par deux agents pathogènes (VIH-1 et *T.parva*) avec des PP2A (PP2A1 et sous-unité A).

10

Les résultats obtenus après l'incubation des membranes contenant les peptides recouvrant les séquences de Vpr de VIH-1 et CK2 α de *T.parva* avec l'holoenzyme PP2A trimérique purifiée ont permis de déterminer cinq séquences de peptides de Vpr et de CK2 α capables de lier spécifiquement PP2A et présentées dans le tableau ci-après :

15

Tableau 1 Séquences peptidiques contenant des sites de liaison de HIV-1-Vpr et CK2 α avec les PP2A

		Sous-unité A	PP2A1
HIV-1 Vpr	Site 1 Site 2	RHSRIGIIQQRRTRNG VEALIRILQQQLLFIHFRI	RHSRIGIIQQRRTRNG
T.parva Ck2 α	Site 1 Site 2 Site 3	RKIGRGKFSEVFEG TVTKDKCVIKILKPVKKKKIKREIKILQNL KILRLIDWGLAEFYHP	KILRLIDWGLAEFYHP

20

Plus précisément, deux séquences peptidiques contenant un site de liaison de Vpr de VIH-1 avec la protéine PP2A1 (Fig.1B. "site 1") et avec la sous-unité A (Fig.1A "site 1" et "site 2") ont été identifiées. Trois séquences peptidiques contenant un site de liaison de CK2 α de *T. parva*

avec la protéine PP2A1 (Fig.2B "site 3") et avec la sous-unité structurale A ont aussi été identifiées (Fig.2A" site 1", " site 2" et "site 3").

B.2 Intérêt de l'utilisation des peptides de Vpr de VIH-1 qui lient

PP2A

10 L'expression, exogène ou due à l'infection provirale, de Vpr de VIH-1 induit l'apoptose des cellules HeLa, des lignées lymphoïdes T et des lymphocytes primaires (Stewart *et al.*, 1997 *J Virol* 71: 5579-9). L'utilisation de mutants Vpr a dans un premier temps permis de corréler cet effet à l'arrêt des cellules en phase G2 du cycle cellulaire. Plus récemment on a montré que Vpr peut aussi induire l'apoptose indépendamment de l'arrêt en G2 (Nishizawa *et al.* 2000 *Virology* 27: 16-26).

15 Il a été rapporté que l'activation de PP2A après interaction avec la protéine adénovirale E4orf4, induit l'apoptose dans les cellules transformées (Shtrichman R *et al.*, 2000 *Oncogene* 19: 3757-3765). De façon analogue l'expression de Vpr induit aussi l'apoptose dans les cellules transformées (Stewart *et al.* 1999, *PNAS* 96: 12039-12043).

20 Par ailleurs, l'analyse des mutants de Vpr connus dans l'état de la technique indique que les peptides identifiés par le procédé de l'invention et liant spécifiquement la protéine PP2A, contiennent des séquences qui corrèlent avec celles requises pour l'effet pro-apoptotique de Vpr.

25 Ainsi, les fragments des protéines virales, Vpr et E4orf4 qui interagissent avec PP2A et identifiés par le procédé de l'invention pourraient être utiles pour induire l'apoptose des cellules tumorales.

Les peptides identifiés sont aussi naturellement utiles dans l'inhibition de l'infection par le VIH, voire d'autres virus apparentés.

B.3 Intérêt de l'utilisation des séquences de CK2 α de *T.parva* qui lient PP2A

5 L'utilisation de l'acide okadaïque et de l'antigène petit t de SV40 a permis de démontrer que la PP2A contrôle la prolifération cellulaire via une nouvelle cascade de phosphorylations impliquant la PI3-kinase, la PKC ξ (identifiée comme une MAP-Kinase-Kinase-Kinase ou MEKK), la protéine MEK et les deux MAP-Kinases ERK-1 et ERK-2 et les facteurs de transcription NF- κ B et Sp1 (Sontag,E., Sontag,J.M., Garcia.A. (1997).
10 *EMBO.J.*, 16, 5662-5671; Ayllón, V., Martinez-A., C., Garcia.A., Cayla, X. and Rebollo, A (2000). *EMBO J.* 19, 1-10, A.Garcia, S.Cereghini., E.Sontag (2000). *J.Biol Chem.* 275 :9385-9389). Par ailleurs le rôle de PP2A dans la régulation de la cascade des MAP-kinases a aussi été suggéré par les travaux de l'équipe de Chambaz (Hériché *et al.* (1997), *Science*, 276: 952-955) qui ont montré que la surexpression de la sous-unité CK2 α cellulaire active PP2A qui déphosphoryle la protéine Mek.
15

20 Les travaux de Ole-Moi et coll. (*EMBO J.* (1993) 12: 1621-1631) ont montré que la transformation par *Theileria* induit une hyperphosphorylation des protéines de l'hôte. Cet effet est en partie dû à l'activation constitutive de la CK2 cellulaire qui serait elle même dépendante de l'action d'une sous unité de type CK2 α codée par le parasite et sécrétée dans le cytosol de la cellule transformée.

25 Comme indiqué ci-dessous, la comparaison des séquences identifiées par le procédé de l'invention correspondant aux trois sites de liaison avec PP2A permet d'identifier la présence d'un motif du type: K-I-G/L-R/K qui est partiellement répété dans le site 2

Site 1 : **KIGR**

Site 2 : **KILKPVKKKKIKREKILQNL**,

Site 3 : **KIL RLI** (duplication partielle KIL/RLI).

Il est intéressant de noter que le site de liaison de l'ATP de CK2 α recouvre partiellement le site 1 et le site 2, ce qui suggère une inhibition de l'activité kinase après interaction de CK2 α avec la sous-unité A. Par ailleurs, comme on peut le constater dans le tableau 2 ci-après, les trois séquences contenant les sites de liaison de CK2 α de *T. parva* avec PP2A sont conservées parmi plusieurs espèces comprenant les parasites *P.falciparum* et *Leishmania*.

Tableau 2 Comparaison des diverses séquences de CK2 α avec les peptides de *T.parva* contenant les sites de liaison avec PP2A (les séquences de *P.falciparum* sont déduites d'une EST, les autres viennent de la Banque génomique « Swissprot »). Seuls les résidus qui diffèrent de la séquence de *T. parva* sont indiqués.

Site 1

<i>T.parva</i> / <i>Leishmania</i>	R KIGRGKFSEV FEG
<i>Pfalciparum</i> /Bovine/Dictyo	■

20

Site 2

<i>T.parva</i>	TVTK D K C VIKI LKPVKKKKIKREIKI LQNL
<i>Pfalciparum</i>	■ C ■ ■ ■ A V
Bovine	N N E V
<i>Leishmania</i>	NN ■ V V V
<i>Leishmania</i>	V ■ Q V
Dictyo	- L ■ ■ T

25

Site 3

<i>T.parva</i>	K I L RLIDWGLAEFYH P
<i>Leishmania</i>	■ ■ I
<i>Pfalciparum</i>	R Q ■
Bovine	R ■
Dictyo	■ ■

30

35

L'analyse fine des interactions suggère que les CK2 α de ces différentes espèces devraient interagir avec PP2A; par exemple le peptide 131 de CK2 α de *T.parva* décrit à la figure 2 et dans lequel les quatre premiers acides aminés du site 3 sont déletés est capable de lier PP2A. Ceci suggère que les CK2 α de *Leishmania*, de *P.falciparum* qui diffèrent pour les 3 premiers acides aminés devraient lier PP2A. Ceci est consistant avec le fait que le motif KILRLI présente une duplication de K/R-II/L-I/L qui, dans un contexte basique, pourrait être un site de liaison pour PP2A.

La présence, à l'intérieur de la cellule de ces peptides, correspondant aux sites de liaison *in vivo* des protéines avec PP2A, pourrait donc contrarier le développement de ces parasites.

B.4 Préparation de composés permettant de transférer les peptides de l'invention dans les cellules

A partir d'anticorps anti-ADN qui sont capables de pénétrer les cellules vivantes, l'équipe du Pr Avrameas (A. Avrameas *et al. PNAS* (1998) 95, 5601-5606) a dérivé des peptides qui peuvent faire pénétrer dans les cellules des petits peptides ou des protéines de poids très élevés, comme des anticorps, des enzymes et des plasmides. Il est possible de tester la survie des cellules cancéreuses et la réplication des cellules infectées par le virus VIH-1, après la mise en contact de ces cellules avec des peptides résultant de la fusion du peptide de pénétration généré par la méthode de Diatos avec les peptides représentant les sites de liaison de PP2A avec HIV-Vpr et CK2 α de *Theileria*. En inhibant de façon compétitive les interactions des protéines codées par des pathogènes avec des PP2A, il serait possible d'inhiber les effets liés à la régulation du système PP2A par ces mêmes pathogènes.

Ceci peut avoir deux conséquences très intéressantes :

- Inhiber l'infection du VIH en utilisant les peptides Vpr.
- Induire l'apoptose dans les cellules transformées (en utilisant les peptides Vpr et CK2 α) ou encore,
- perturber certaines infections parasitaires (paludisme) (Peptides CK2 α de *P.Falciparum*).

REVENDICATIONS

1. Peptide d'une taille inférieure à 30 acides aminés, de préférence inférieure à 20 acides aminés, caractérisé en ce qu'il lie *in vitro*, de manière spécifique, une holoenzyme protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités et en ce qu'il s'agit
 - 5 a) d'un fragment d'une protéine virale, parasitaire ou cellulaire, choisie parmi les séquences suivantes : antigène t de SV40 ou de polyôme, antigène moyen t de polyôme, sous unité de PP2A de type B (B₁, B₂, B₃), CXCR2 (récepteur de chemokine), CK2 α , CaMV, p70S6-kinase, Pak1/Pak3, Tap42/alpha 4, PTPA, Set/I1/I2-PP2A, E4orf4, tau, CD28 ou Vpr ; ou,
 - 10 b) une séquence se distinguant du fragment de protéine défini en a) par substitution ou délétion d'acides aminés, ladite séquence distincte conservant néanmoins les propriétés de liaison à la protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités.
2. Peptide selon la revendication 1 caractérisé ce que ladite protéine virale, parasitaire ou cellulaire est la protéine Vpr du virus VIH.
- 20 3. Peptide selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que ladite protéine Vpr est issue du virus VIH-1 ou VIH-2.
4. Peptide selon la revendication 3 caractérisé en ce qu'il est inclus dans l'une des séquences suivantes :
 - 25 a) VEALIRILQQLLFIHFRI (SEQ ID NO :1),
 - b) RHSRIGIIQQRTRNG (SEQ ID NO:2), ou
 - c) une séquence se distinguant de SEQ ID NO :1 ou SEQ ID NO :2 par substitution ou délétion d'acides aminés, ladite séquence distincte conservant néanmoins les propriétés de liaison pour la protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités.

5. Peptide selon la revendication 1 caractérisé en ce que ladite protéine virale, parasitaire ou cellulaire est la protéine CK2 α .
6. Peptide selon la revendication 1 ou 5 caractérisé en ce que ladite protéine CK2 α est issue du parasite *Theileria parva*.
7. Peptide selon la revendication 6 caractérisé en ce qu'il est inclus dans l'une des séquence suivantes :
 - a) RKIGRGKFSEVFEG (SEQ ID NO :3);
 - b) TVTKDCVIKILKPVKKKKIKREIKILQNL (SEQ ID NO: 4);
 - c) KILRLIDWGLAEFYHP (SEQ ID NO:5), ou,
 - d) Une séquence homologue de SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :4 ou SEQ ID NO :5 dérivée de *P. falciparum* ou *leishmania*, ou,
 - e) une séquence se distinguant des séquences mentionnées ci-dessus par substitution ou délétion d'acides aminés, ladite séquence distincte conservant néanmoins les propriétés de liaison à la protéine phosphatase 2A ou l'une de ses sous-unités.
8. Peptide selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il est couplé à un vecteur capable de transférer ledit peptide dans une cellule eucaryote.
9. Peptide selon la revendication 4 pour son utilisation pour l'induction de l'apoptose des cellules tumorales.
10. Peptide selon la revendication 6 pour son utilisation pour la réduction du développement parasitaire.
11. Peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 pour son utilisation pour l'inhibition de manière compétitive, de l'interaction de la protéine native dont il est issu avec une holoenzyme PP2A ou l'une de ses sous-unités.
12. Polypeptide caractérisé en ce qu'il est constitué de la répétition d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

13. Polynucléotide caractérisé en ce que sa séquence consiste en la séquence codante d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

5 14. Polynucléotide caractérisé en ce que sa séquence est choisie parmi l'une des séquences suivantes SEQ ID NO : 26 , NO : 27, NO : 28, NO : 29 ou NO : 30.

10 15. Polynucléotide caractérisé en ce qu'il consiste en un multimère du polynucléotide selon la revendication 13.

16. Vecteur d'expression cellulaire, caractérisé en ce qu'il comporte un polynucléotide selon l'une des revendications 13 à 15 et des séquences régulatrices permettant l'expression d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 dans une cellule hôte.

15 17. Anticorps purifié polyclonal ou monoclonal caractérisé en ce qu'il est capable de lier de façon spécifique l'un quelconque des peptides selon l'une des revendications 1 à 8.

18. Composition pharmaceutique comprenant l'un des peptides selon l'une des revendications 1 à 8 en combinaison avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

20 19. Composition pharmaceutique comprenant un des éléments choisis parmi un polynucléotide selon l'une des revendications 13 à 15, un vecteur d'expression selon la revendication 16 ou un anticorps selon la revendication 17.

25 20. Utilisation des peptides définis selon l'une des revendications 1 à 8 dans la préparation d'un médicament utile dans le traitement d'une infection virale ou parasitaire.

21. Utilisation d'un peptide défini selon l'une des revendications 2 à 4, dans la préparation d'un médicament apte à inhiber l'infection au VIH.

30 22. Utilisation d'un peptide défini selon l'une des revendications 5 à 8, dans la préparation d'un médicament apte à induire l'apoptose de cellules cibles, et en particulier de cellules tumorales.

23. Utilisation d'un peptide défini selon l'une des revendications 6 à 8, dans la préparation d'un médicament apte à inhiber l'infection parasitaire.

24. Utilisation d'un peptide défini selon l'une des revendications 6 à 8, dans la préparation d'un médicament utile dans le traitement du paludisme.

5 25. Utilisation d'un polynucléotide selon l'une des revendications 13 à 15 ou d'un anticorps selon la revendication 17 dans le diagnostic *in vitro* de pathologies parasitaires ou virales.

10 26. Méthode d'identification d'un peptide dont la séquence est issue d'une protéine virale, parasitaire ou cellulaire, ledit peptide liant spécifiquement une holoenzyme protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités, ladite méthode comprenant les étapes consistant à :

15 a) déposer sous forme de spots, sur un support, des peptides dont la séquence est issue d'une protéine virale, parasitaire ou cellulaire, chaque spot correspondant au dépôt d'un peptide de séquence définie,

20 b) mettre en contact le support solide avec une solution contenant l'holoenzyme protéine phosphatase 2A ou l'une de ses sous-unités, dans des conditions permettant aux peptides présents sur le support, de lier l'holoenzyme ou l'une de ses sous-unités, et,

25 c) à identifier sur le support solide, le peptide sur lequel se fixe la protéine phosphatase 2A ou l'une de ses sous-unités.

27. Méthode selon la revendication 26 caractérisée en ce que les peptides déposés sous forme de spot sont d'une taille inférieure à 20 acides aminés, de préférence inférieure à 15 acides aminés.

30 28. Méthode selon l'une quelconque des revendications 26 ou 27 caractérisée en ce que les peptides sont déposés sur une membrane de cellulose.

29. Méthode selon l'une quelconque des revendications 26 à 28 caractérisée en ce que l'ensemble des peptides déposés recouvre la séquence complète de la protéine virale, parasitaire ou cellulaire dont les séquences sont issues.

5 30. Méthode de préparation d'un peptide tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 comprenant la transformation d'un hôte cellulaire à l'aide d'un vecteur d'expression cellulaire tel que défini à la revendication 16, suivi de la mise en culture de l'hôte cellulaire ainsi transformé, et la récupération du peptide dans le

10 milieu de culture.

2827866

1/2

Fig.1A

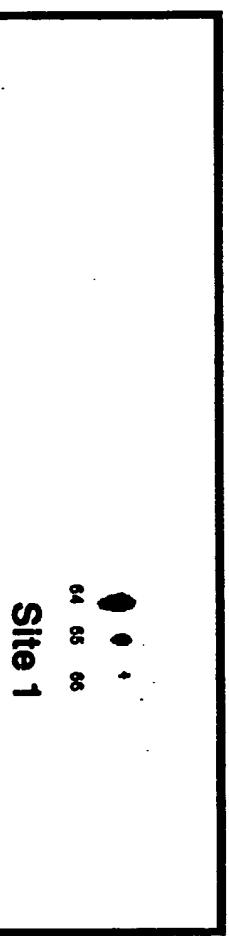
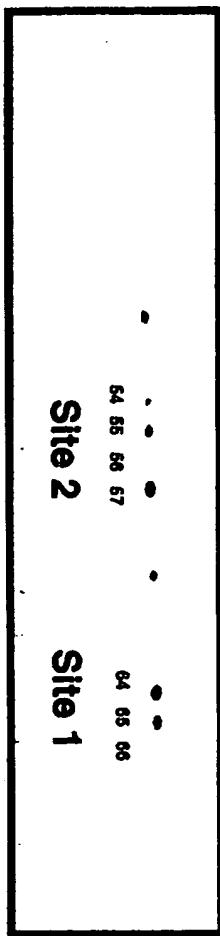


Fig.1B

2827866

2/2

Fig.2A

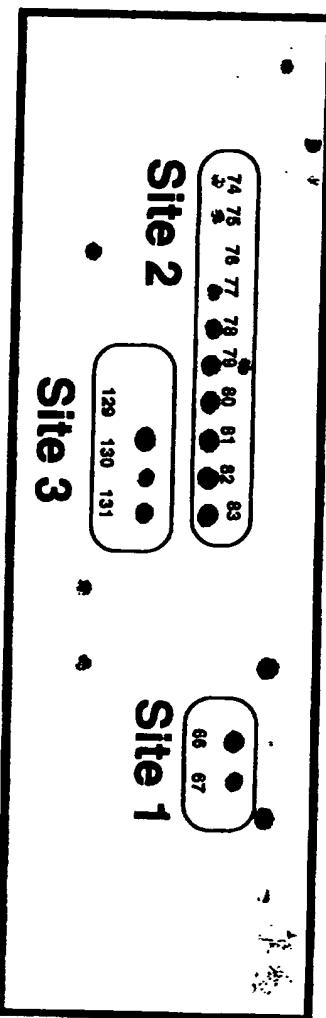
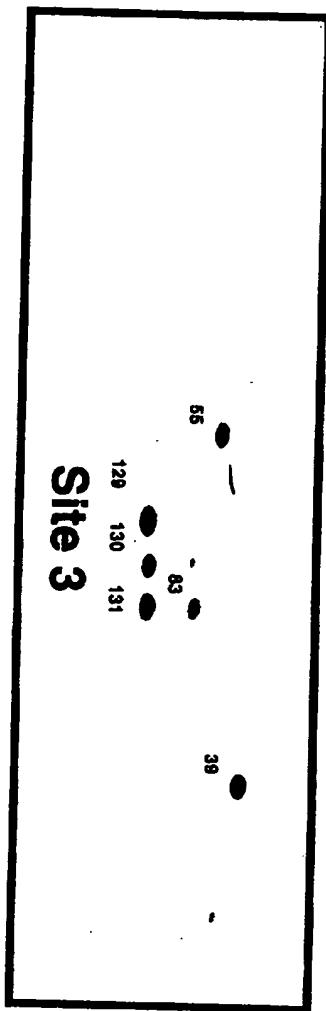


Fig.2B



LISTE DES SEQUENCES

<110> INSTITUT PASTEUR

<120> PEPTIDES SYNTHETIQUES OU NATURELS LIANT LA PROTEINE
PHOSPHATASE 2A, METHODE D'IDENTIFICATION ET
UTILISATIONS.

<130> 4894_DBO

<140>

<141>

<160> 52

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 18

<212> PRT

<213> virus HIV

<400> 1

Val Glu Ala Leu Ile Arg Ile Leu Gln Gln Leu Leu Phe Ile His Phe

1

5

10

15

Arg Ile

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> virus HIV

<400> 2

Arg His Ser Arg Ile Gly Ile Ile Gln Gln Arg Arg Thr Arg Asn Gly

1

5

10

15

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Theileria parva

<400> 3

2827866

Arg Lys Ile Gly Arg Gly Lys Phe Ser Glu Val Phe Glu Gly
1 5 10

<210> 4
<211> 29
<212> PRT
<213> Theileria parva

<400> 4
Thr Val Thr Lys Asp Cys Val Ile Lys Ile Leu Lys Pro Val Lys Lys
1 5 10 15
Lys Lys Ile Lys Arg Glu Ile Lys Ile Leu Gln Asn Leu
20 25

<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> Theileria parva

<400> 5
Lys Ile Leu Arg Leu Ile Asp Trp Gly Leu Ala Glu Phe Tyr His Pro
1 5 10 15

<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> virus HIV

<400> 6
Val Glu Ala Leu Ile Arg Ile Leu Gln Gln Leu Leu
1 5 10

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> virus HIV

<400> 7
Ala Leu Ile Arg Ile Leu Gln Gln Leu Leu Phe Ile

1

5

10

<210> 8
<211> 12
<212> PRT
<213> virus HIV

<400> 8
Ile Arg Ile Leu Gln Gln Leu Leu Phe Ile His Phe
1 5 10

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> virus HIV

<400> 9
Ile Leu Gln Gln Leu Leu Phe Ile His Phe Arg
1 5 10

<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> virus HIV

<400> 10
Arg His Ser Arg Ile Gly Ile Ile Gln Gln Arg Arg
1 5 10

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> virus HIV

<400> 11
Ser Arg Ile Gly Ile Ile Gln Gln Arg Arg Thr Arg
1 5 10

<210> 1
<211> 12
<212> PRT
<213> virus HIV

<400> 12
Ile Gly Ile Ile Gln Gln Arg Arg Thr Arg Asn Gly
1 5 10

<210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> Theileria parva

<400> 13
Thr Val Thr Lys Asp Lys Cys Val Ile Lys Ile Leu
1 5 10

<210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> Theileria parva

<400> 14
Thr Lys Asp Lys Cys Val Ile Lys Ile Leu Lys Pro
1 5 10

<210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> Theileria parva

<400> 15
Asp Lys Cys Val Ile Lys Ile Leu Lys Pro Val Lys
1 5 10

<210> 16
<211> 12
<212> PRT
<213> Theileria parva

<400> 16

Cys Val Ile Lys Ile Leu Lys Pro Val Lys Lys Lys
1 5 10

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Theileria parva

<400> 17

Ile Lys Ile Leu Lys Pro Val Lys Lys Lys Ile
1 5 10

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> Theileria parva

<400> 18

Ile Leu Lys Pro Val Lys Lys Lys Lys Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> Theileria parva

<400> 19

Lys Pro Val Lys Lys Lys Ile Lys Arg Glu Ile
1 5 10

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> Theileria parva

<400> 20

Val Lys Lys Lys Lys Ile Lys Arg Glu Ile Lys Ile
1 5 10

<210> 21
<211> 12
<212> PRT
<213> Theileria parva

<400> 21
Lys Lys Lys Ile Lys Arg Glu Ile Lys Ile Leu Gln
1 5 10

<210> 22
<211> 12
<212> PRT
<213> Theileria parva

<400> 22
Lys Ile Lys Arg Glu Ile Lys Ile Leu Gln Asn Leu
1 5 10

<210> 23
<211> 12
<212> PRT
<213> Theileria parva

<400> 23
Lys Ile Leu Arg Leu Ile Asp Trp Gly Leu Ala Glu
1 5 10

<210> 24
<211> 12
<212> PRT
<213> Theileria parva

<400> 24
Leu Arg Leu Ile Asp Trp Gly Leu Ala Glu Phe Tyr
1 5 10

<210> 25

2827866

<211> 12
<212> RTT
<213> Theileria parva

<400> 25
Leu Ile Asp Trp Gly Leu Ala Glu Phe Tyr His Pro
1 5 10

<210> 26
<211> 54
<212> ADN
<213> virus HIV

<400> 26
gtgaaagcct taataagaat tctgcaacaa ctgctgtta ttcatttcag aatt 54

<210> 27
<211> 48
<212> ADN
<213> virus HIV

<400> 27
cgacatagca gaataggcat tattcaacag aggagaacaa gaaatgga 48

<210> 28
<211> 42
<212> ADN
<213> Theileria parva

<400> 28
aggaagatcg gaagagggaa gttcagtgaa gttttgagg ga 42

<210> 29
<211> 90
<212> ADN
<213> Theileria parva

<400> 29
acagtaacga aggataaaatg cgtataaaaa atcctaaagc ctgtaaagaa gaagaaaatc 60
aagagagaga ttaagattct acagaaccta 90

<210> 30

<211> 48
 <212> ADN
 <213> Theileria parva

<400> 30
 aaaatactaa ggcttaattga ctggggatta gctgagttt accaccca

48

<210> 31
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> virus HIV

<400> 31
 Val Glu Ala Leu Ile Arg Ile Leu Gln Gln Leu Leu
 1 5 10

<210> 32
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> virus HIV

<400> 32
 Ala Leu Ile Arg Ile Leu Gln Gln Leu Leu Phe Ile
 1 5 10

<210> 33
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> virus HIV

<400> 33
 Ile Arg Ile Leu Gln Gln Leu Leu Phe Ile His Phe
 1 5 10

<210> 34
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> virus HIV

<400> 34
 Ile Leu Gln Gln Leu Leu Phe Ile His Phe Arg Ile

1

5

10

<210> 35

<211> 12

<212> PRT

<213> virus HIV

<400> 35

Arg His Ser Arg Ile Gly Ile Ile Gln Gln Arg Arg
1 5 10

<210> 36

<211> 12

<212> PRT

<213> virus HIV

<400> 36

Ser Arg Ile Gly Ile Ile Gln Gln Arg Arg Thr Arg
1 5 10

<210> 37

<211> 12

<212> PRT

<213> virus HIV

<400> 37

Ile Gly Ile Ile Gln Gln Arg Arg Thr Arg Asn Gly
1 5 10

<210> 38

<211> 12

<212> PRT

<213> Theileria parva

<400> 38

Arg Lys Ile Gly Arg Gly Lys Phe Ser Glu Val Phe
1 5 10

<210> 39
<211> 12
<212> PRT
<213> Theileria parva

<400> 39
Ile Gly Arg Gly Lys Phe Ser Glu Val Phe Glu Gly
1 5 10

<210> 40
<211> 12
<212> PRT
<213> Theileria parva

<400> 40
Thr Val Thr Lys Asp Lys Cys Val Ile Lys Ile Leu
1 5 10

<210> 41
<211> 12
<212> PRT
<213> Theileria parva

<400> 41
Thr Lys Asp Lys Cys Val Ile Lys Ile Leu Lys Pro
1 5 10

<210> 42
<211> 12
<212> PRT
<213> Theileria parva

<400> 42
Asp Lys Cys Val Ile Lys Ile Leu Lys Pro Val Lys
1 5 10

<210> 43
<211> 12
<212> PRT
<213> Theileria parva

<890> 43

Cys Val Ile Lys Ile Leu Lys Pro Val Lys Lys Lys
1 5 10

<210> 44

<211> 12

<212> PRT

<213> Theileria parva

<400> 44

Ile Lys Ile Leu Lys Pro Val Lys Lys Lys Ile
1 5 10

<210> 45

<211> 12

<212> PRT

<213> Theileria parva

<400> 45

Ile Leu Lys Pro Val Lys Lys Lys Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 46

<211> 12

<212> PRT

<213> Theileria parva

<400> 46

Lys Pro Val Lys Lys Lys Ile Lys Arg Glu Ile
1 5 10

<210> 47

<211> 12

<212> PRT

<213> Theileria parva

<400> 47

Val Lys Lys Lys Ile Lys Arg Glu Ile Lys Ile
1 5 10

<210> 48
<211> 12
<212> PRT
<213> Theileria parva

<400> 48
Lys Lys Lys Ile Lys Arg Glu Ile Lys Ile Leu Gln
1 5 10

<210> 49
<211> 12
<212> PRT
<213> Theileria parva

<400> 49
Lys Ile Lys Arg Glu Ile Lys Ile Leu Gln Asn Leu
1 5 10

<210> 50
<211> 12
<212> PRT
<213> Theileria parva

<400> 50
Lys Ile Leu Arg Leu Ile Asp Trp Gly Leu Ala Glu
1 5 10

<210> 51
<211> 12
<212> PRT
<213> Theileria parva

<400> 51
Leu Arg Leu Ile Asp Trp Gly Leu Ala Glu Phe Tyr
1 5 10

<210> 52

2827866

<211> 12

<212> PRT

<213> Theileria parva

<400> 52

Leu Ile Asp Trp Gly Leu Ala Glu Phe Tyr His Pro

1

5

10

RAPPORT DE RECHERCHE 2827863

PRÉLIMINAIRE PARTIEL

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

N° d'enregistrement
référentielFA 611577
FR 0110139

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concordées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 98 01563 A (MARCELLUS RICHARD C ; LAVOIE JOSEE N (CA); SHORE GORDON C (CA); TEO) 15 janvier 1998 (1998-01-15) * revendications; figure 1A *	1, 9, 18, 22	C07K7/04 C07K14/44 C07K14/155 C07K16/20 C07K16/10 C12N15/30 C12N15/48 C12N15/63 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/566 A61K38/17 A61K39/395 A61K48/00 A61K39/21
X	FAULKNER N E ET AL: "Protein phosphatase 2A activates the HIV-2 promoter through enhancer elements that include the pets site." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. UNITED STATES 13 JUL 2001, vol. 276, no. 28, 13 juillet 2001 (2001-07-13), pages 25804-25812, XP002201695 ISSN: 0021-9258	1, 9, 18, 22	
A	WO 01 04629 A (UNIV MCGILL) 18 janvier 2001 (2001-01-18) * revendications; exemples *	1, 9, 18, 22	
A	MORENO C S ET AL: "WD40 repeat proteins striatin and S/G(2) nuclear autoantigen are members of a novel family of calmodulin-binding proteins that associate with protein phosphatase 2A." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. UNITED STATES 25 FEB 2000, vol. 275, no. 8, 25 février 2000 (2000-02-25), pages 5257-5263, XP002201696 ISSN: 0021-9258 * figure 1 *	1, 10, 18, 20	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.Cl.7) C07K C12N A61K G01N
		-/-	
2			
	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur	
	10 juin 2002	Fuhr, C	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrête-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

**RECHERCHE INCOMPLÈTE
FEUILLE SUPPLEMENTAIRE C**FA 611577
FR 0110139

Certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche ou ont fait l'objet d'une recherche incomplète, à savoir :

Raison :

Les revendications 1-25 et 30 présentes ont trait à des composés définis en faisant référence à une caractéristique ou propriété souhaitable, à savoir le pouvoir de se lier à une holoenzyme protéine phosphatase de type 2A. Les revendications couvrent tous les composés présentant cette caractéristique ou propriété, alors que la demande ne fournit un fondement au sens de l'Article L612-6 CPI et/ou un exposé au sens de l'Article L612-5 CPI que pour un nombre très limité de tels composés. Dans le cas présent, les revendications manquent de fondement et la demande manque d'exposé à un point tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible. Indépendamment des raisons évoquées ci-dessus, les revendications manquent aussi de clareté. En effet, on a cherché à définir les composés au moyen du résultat à atteindre. Ce manque de clareté est, dans le cas présent, de nouveau tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible.

En conséquence, la recherche n'a été effectuée que pour les parties des revendications dont l'objet apparaît être clair, fondé et suffisamment exposé, à savoir les parties concernant les composés décrits dans les exemples et dénommés dans la liste des séquences par les numéros 1-5. La recherche couvre aussi les méthodes, les compositions, les anticorps et les polynucléotides qui se réfèrent à ces composés.

RAPPORT DE RECHERCHE 2827866

PRÉLIMINAIRE PARTIEL

N° d'enregistrement
national

établi sur la base des dernières revendications

déposées avant le commencement de la recherche

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

FA 611577

FR 0110139

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	<p>MORENO C S ET AL: "A mammalian homolog of yeast MOB1 is both a member and a putative substrate of striatin family-protein phosphatase 2A complexes." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. UNITED STATES 29 JUN 2001, vol. 276, no. 26, 29 juin 2001 (2001-06-29), pages 24253-24260, XP002201697 ISSN: 0021-9258</p> <p>* page 24258, colonne de droite, alinéa 1 - page 24259, colonne de droite, dernier alinéa *</p>	1,10,18,20	
X	<p>DATABASE EMBL 'en ligne! VPR Protein (fragment), 1 mai 1997 (1997-05-01) Database accession no. P89821 XP002201698 * abrégé *</p>	1-4	
X	<p>DATABASE EMBL 'en ligne! Ca2+/Calmodulin-dependent Protein Kinase V (frag, 1 mai 2000 (2000-05-01) Database accession no. Q9QV79 XP002201699 * abrégé *</p>	1,7	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
2			
	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur	
	10 juin 2002	Fuhr, C	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : amère-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF À LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0110139 FA 611577

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **10-06-2002**.

Les renseignements fournis sont données à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 9801563	A 15-01-1998	AU	731924 B2	05-04-2001
		AU	3860197 A	02-02-1998
		CA	2259152 A1	15-01-1998
		EP	0951553 A2	27-10-1999
		WO	9801563 A2	15-01-1998
		JP	2000515504 T	21-11-2000
WO 0104629	A 18-01-2001	AU	5959200 A	30-01-2001
		WO	0104629 A1	18-01-2001
		EP	1196773 A1	17-04-2002